

**Inzulinutázó vanádium-, és cinkkomplexek kölcsönhatásának vizsgálata  
vérszérum fehérjékkel**

Mivel a vizsgált komplexek inzulinutázó hatása összetett és a hatásmechanizmusuk csak részben feltárt az irodalomban, a biológiai közegben való viselkedésük és speciációjuk megjósálása egyensúlyi állandók ismeretében fontos információt adhatnak a hatás megértéséhez. A komplexek eredeti formájának minél teljesebb megismerése (pl. oldategyensúlyi mérések révén) természetesen fontosak, de emellett a felszívódásukat követő lehetséges átalakulásokat is vizsgálni kell. A potenciális vércukorszint-csökkentő szerek ugyanis „prodrug”-nak tekinthetők, hiszen a hatásos formájuk nagy valószínűséggel különbözik az eredetitől, pl. a releváns szérumkomponensekhez, ill. sejtalkotókhoz való kötődésük miatt. Munkám során így ezeknek a kölcsönhatásoknak a megismerése állt a középpontban. Az antidiabetikus Zn(II), és VO(IV)-komplexekkel kapcsolatos vizsgálataink eredményét az alábbi pontok szerint foglalom össze:

(1.a.) néhány bizonyítottan antidiabetikus hatású Zn(II)-, és VO(IV)-komplex oldategyensúlyi vizsgálata

(1.b.) *ex vivo* vizsgálatok a Zn(II)-dipikolinsav (dipic) komplexek inzulinutázó hatására vonatkozólag

(1.c.) antidiabetikus hatású Zn(II)-, és VO(IV)-komplexek, valamint hordozó ligandumaik hidro-lipofil tulajdonságai

(2.a.) Zn(II)-komplexek vegyes ligandumú komplexeinek képződése a sejtben nagy koncentrációban megtalálható potenciális cinkkötő vegyületekkel: redukált L-glutation (GSH) és adenosin 5'-trifoszfát (ATP)

(2.b.) Zn(II)-komplexek vegyes ligandumú komplexeinek képződése kis molekulatömegű szérumkomponensekkel (cisztein(Cys), hisztidin (His), citromsav(cit)); néhány VO(IV)-komplex vegyes ligandumú komplexeinek képződése kis molekulatömegű szérumkomponensekkel (cit, tejsav, foszfát)

(2.c.) Zn(II)-, és VO(IV)-komplexek kölcsönhatása nagy molekulatömegű szérumkomponensekkel: humán szérum albumin (HSA) és humán szérum transzferrin (Tf)

(3.) szérumfehérjék és a fémkomplexek hordozó ligandumai közötti kölcsönhatások.

(1.a.) A fokhagymából izolált természetes eredetű *allixin* és annak *N-metil-tio-származékának* Zn(II)-komplexeit vizsgáltuk pH-potenciometriás mérésekkel. Ezen komplexek igen kiemelkedő inzulinutánzó szerek, de *in vivo* alkalmazásuk során a tio-származék bizonyult hatásosabbnak. Oldategyensúlyi vizsgálataink azt mutatták, hogy az (S<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) koordinációjú N-metil-tio-allixin komplexe sokkal stabilisabb, ami a bélrendszerből való felszívódásnál valószínűleg előnyt jelent.

Néhány aminosav (His, Ile, Trp) 5-metoxi-karbonil-pikolinsav származékának antidiabetikus hatást mutató VO(IV)-komplexeit is vizsgáltuk elsősorban pH-potenciometriás módszerrel. Meghatároztuk a képződő komplexek összetételét, stabilitási állandóit, javaslatot tettünk a legvalószínűbb kötésmódokra, amit az ESR mérések is alátámasztottak. Megállapítottuk, hogy ezen ligandumokkal a komplexképződés már kis pH-n is jelentős, azaz a vizsgált VO(IV)-komplexek a gyomor savas pH-ján nagy valószínűséggel stabilisak. Fiziológiás pH mindegyik esetben a [VO(L)(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>(OH)]<sup>-</sup> (n=2,3) összetételű komplexek bizonyultak dominánsnak.

(1.b.) A vizsgálataink középpontjában álló Zn(II) komplexek (hordozó ligandumok: maltol (mal); 3-hidroxi-1,2-dimetil-hidroxi-piridinon (dhp), pikolinsav (pic), 6-metil-pikolinsav (6-Me-pic)) inzulinutánzó hatása mind *in vivo*, *in vitro* tanulmányozott az irodalomban, azonban a Zn(II)-dipic komplexek esetén hiányoztak ilyen adatok. Ezért a Szegedi Biológiai Kutatóintézet (SZBK) Genetikai Tanszékével közösen *ex vivo* tanulmányoztuk a Zn(II)-dipic komplexek biológiai hatását humán Mono Mac és 3T3-L1 adipocita sejtvonalakon, ill. összehasonlítóként a mal és pic komplexeit is vizsgáltuk. A toxicitás vizsgálatok azt mutatták, hogy 100 µM koncentráció alatt a Zn(II) komplexek gyakorlatilag nem toxikusak. Mitokondrionális dehidrogenáz aktivitás mérése (EZ4U assay) közvetett információt szolgáltat a komplexek inzulinutánzó hatására vonatkozólag. Mind a három ligandum fémkomplexe hasonló aktivitást mutatott az 1-100 µM koncentrációtartományban, viszont ettől nagyobb koncentrációk esetén egyedül a dipic mutatott növekvő mitokondrionális aktivitást, valószínűleg a Zn(II)-mal és Zn(II)-pic komplexek nagyobb koncentrációknál jelentkező toxicitása miatt.

(1.c.) Az inzulinutánzó Zn(II)- és VO(IV)-komplexek lipo-hidrofil sajátsága fontos fizikai paraméter a feltételezett passzív membrántranszport szempontjából. Ezekre a komplexekre az irodalomban megtalálható oktanol/víz megoszlási hányadosok meghatározásánál általában a ligandumok UV sávjaikat használják fel, ezekből az adatokból azonban nem számítható a fémkomplex oktanolos fázisba történő átoldódása, hisz így az átoldódott, de komplexben nem

kötött ligandumot is mérik. Másrészt az oktanolos és vizes fázisban mért spektrumok közvetlenül nem is hasonlíthatók össze (csak az extrakció előtti vizes oldat, és az az utáni vizes fázis). Sok esetben a pH-független megoszlási hányados (P) és a pH-függő megoszlási állandó (D) használata is összekeveredik. Mivel számos esetben szoros korrelációt feltételeznek a fémkomplexek lipofilitása és a biológiai hatásosság között, ezért fontosak a megbízható(bb) módon meghatározott paraméterek ismerete. Pl. ICP-AES mérések segítségével, a fémionok oldaláról megközelítve az átoldódást, megbízhatóbb információkat kaptunk a komplexek lipo-hidrofil sajátosságára vonatkozólag. Az víz-oktanol közötti egyensúlyi folyamatok mellett a teljes képhez és a P, D értékek számolásához a vizes fázisban az adott pH-n lejátszódó komplex disszociációs folyamatok, a komplexek és a ligandumok egyedi UV spektrumainak ismerete is fontos. Széles pH-tartományban történt vizsgálataik segítségével megállapítottuk, hogy a semleges töltésű  $[ZnL_2]$  ill.  $[VOL_2]$  komplexek lipofilitása (lgP) lineáris összefüggést mutat a hordozó ligandum lipofilitásával (lgP) a mal, dhp, 2-hidroxi-piridin-1-oxid és 2-merkaptó-piridin-1-oxid esetén, míg a pic, 6-Me-pic, dipic ligandumok esetén nem, valószínűleg a vizes közegben kialakuló ikerionos, ill. erős hidrogén-hidas szerkezetnek köszönhetően.

(2.a.) Oldategyensúlyi módszerekkel (pH-potenciometria, UV-spektrofotometria, CD-spektroszkópia, ESI-MS) tanulmányoztuk öt inzulinutánczó Zn(II)-komplex (mal, dhp, pic, 6-Me-pic, dipic) kölcsönhatását a sejtekben mM-os koncentrációban jelenlévő GSH és ATP ligandumokkal. A képződő vegyes ligandumú komplexek összetételének és stabilitási állandóinak meghatározása mellett megállapítottuk, hogy a dipic-val a legkevésbé kedvezményezett a vegyes komplexek képződése (az ATP-vel nem is tudtunk ilyen komplexeket kimutatni), míg a kétfogú hordozó ligandumok esetén a sejtben feltételezhető koncentrációviszonyok mellett fiziológiás pH-n minden esetben számolni lehet a Zn(II) – hordozó ligandum – GSH /ATP vegyes komplexek kialakulásával.

(2.b.) A vérérszék kis molekulatömegű alkotói közül a cinkmegkötő-képességük és a szérumkoncentrációjuk alapján a cit, His és a Cys kölcsönhatása lehet számottevő az inzulinutánczó Zn(II)-komplexszel, ezért meghatároztuk ezekkel a szérumalkotókkal képződő vegyes ligandumú komplexek összetételét és stabilitási állandóit. Megállapítottuk, hogy fiziológiás pH-n, a dipic kivételével, képződnek vegyes ligandumú komplexek, és a legkedvezményezettebb a ciszteinnel való kölcsönhatás. A hordozó ligandumok közül a 6-Me-pic esetén valószínűleg a metil-szubsztituens térigénye, ill. a dipic esetén a három

koordinálódó donoratomból miatt *trisz* ( $[ZnABH_x]$ ) vegyes ligandumú komplexek nem képződnek.

Hasonló vizsgálatokat végeztünk néhány VO(IV) – 5-metoxi-karbonil-pikolinsav származék – cit, tejsav, foszforsav vegyes ligandumú rendszerben is. A VO(IV) esetén ugyanis ezen ligandumokkal való kölcsönhatással kell leginkább számolni a vérben. Megállapítottuk, hogy pH = 4-8 tartományban igen jelentős a vegyes ligandumú komplexek képződése ezen kis molekulatömegű szérumban komponensekkel. Minden esetben  $[VOABH_x]$  összetételű komplexek képződését tudtuk számolni a foszfát kivételével, mert a foszfáttal nem képződött mérhető mennyiségű *turner* komplex a mérési körülményeink között.

(2.c.) Mivel általában elmondható, hogy a véráramba kerülő cink ill. vanádium nagy része fehérjékhez kötődik, igen fontos a fémkomplexeink nagy molekulatömegű szérumban alkotókkal, azaz szérumban fehérjékkel való kölcsönhatásainak is a vizsgálata. Általánosan ismert, hogy a vér transzport fehérjei pl. nagymértékben módosíthatják egy gyógyszervegyület biohosszú élettartamát és *in vivo* eloszlását.

A Zn(II) kis (hordozó ligandum, Cys, His, cit) és nagy molekulatömegű komponensek (HSA, Tf) közötti megoszlását vizsgáltuk fiziológiás pH-n ultraszűrővel és azt követő ICP-AES mérésekkel olyan mintákban, melyek releváns koncentrációban tartalmazta ezen vegyületeket és megállapítottuk, hogy a Zn(II) döntő része a fehérje fázishoz kötődik. Hasonló méréseket végeztünk a VO(IV)-mal; VO(IV)-pic ill. különböző VO(IV)-5-metoxi-karbonil-pikolinsav komplex esetén is, de a vanádium kimutatási határa miatt a hatásostól (kb. 10  $\mu$ M) csak jóval nagyobb (200  $\mu$ M) VO(IV) koncentráció mellett. A VO(IV) komplexek esetén is megállapítottuk, hogy a fehérje fázishoz igen nagy mennyiségű vanádium kötődik.

Ilyen összetett rendszerekben (fémion – hordozó ligandum – kis (LMM) és nagy (HMM) molekulatömegű komponensek) kialakuló egyensúlyi viszonyok ismeretében a kialakuló fémion eloszlást a kis és nagy molekulatömegű fázisok között (ill. azon belül is, hogy melyik szérumban fehérjéhez kötődik a fémion inkább) modellszámolások segítségével (PSEQUAD program) meg tudjuk határozni. Ezen modellszámolások azonban rámutattak arra, hogy nem elegendő a (i) fémion-hordozó ligandum, (ii) fémion-LMM, (iii) fémion-HMM és (iv) fémion-hordozó ligandum-LMM rendszerekben képződő fémkomplexek és azok stabilitási állandóinak az ismerete, hanem a teljesebb megértéshez fontos a szérumban fehérjék és a hordozó ligandumok közötti kölcsönhatást is figyelembe venni, melyre vonatkozó irodalmi adatot azonban nem találtunk. Így részletesen vizsgáltuk a fehérje-hordozó ligandum asszociátumokat is (ld. 3.). Megállapítottuk, hogy a fehérje-ligandum komplexek modellbe való bevétele sokkal jobb egyezést hoz a számolt és mért eredmények

között. A modellszámolásaink során megállapítottuk, hogy biológiailag releváns koncentráció viszonyok mellett a Zn(II) esetén a fémion döntően a HSA-hoz kötődik, míg a VO(IV) esetén a Tf a domináns fémmegkötő.

A fent említett fémionok megoszlásra vonatkozó ultraszűrési-ICP(AES) vizsgálatok mellett az antidiabetikus VO(IV)-komplexek esetén valódi vérérum mintákat használva HPLC-ICP(MS) módszerrel az eddigi méréseinkkel illetve modellszámításainkkal összhangban sikerült bizonyítanunk, hogy a VO(IV) szinte kizárólag a Tf-hez kötődik, míg a HSA gyakorlatilag nem köti a fémiont. A Zn(II)-komplexek HSA ill. Tf-hez való kötődését a mal és dipic ligandumok esetén CZE-ICP(MS) mérésekkel sikerült összehasonlítani, a kapott eredmények ezekben az esetekben is jól egyeztek a modellszámolásokkal.

(3.) Részletesen vizsgáltuk a mal, dhp, pic, 6-Me-pic és dipic molekulák kölcsönhatását a Tf-nel és HSA-val fiziológiás pH-n ultraszűrési, spektrofluorimetriás, UV spektrofotometriás, CD spektroszkópiás,  $^1\text{H}$  NMR és CZE mérések segítségével, ill. a megkötődésre vonatkozólag molekulamechanikai számolások is készültek.

Ultraszűréssel fizikailag különválasztható a fehérjéhez kötött és a nem kötődő ligandum. Megoszlása a két frakcióban UV spektrofotometriával mérhető, majd az adatokból a PSEQUAD program segítségével kötési állandókat számoltunk. Megállapítottuk, hogy (i) a ligandumok közül a Tf-hez egyedül a dipic kötődik gyengén, de a szérum körülményeknek megfelelő 25 mM-os  $\text{NaHCO}_3$  jelenlétében ez a kötődés is elhanyagolhatóvá válik; (ii) a HSA esetén viszont fiziológiás pH-n a semleges töltésű dhp egyáltalán nem, míg a többi, főleg negatív töltésű ligandum közül a megkötődés erőssége a következő sorrendet mutatja: dipic > 6-Me-pic > pic > mal; (iii) az HSA-hoz a dipic és 6-Me-pic ligandumokból maximálisan kettő, a pic és mal esetén egy ligandum képes kötődni.  $^1\text{H}$  NMR (Saturation Transfer Difference) mérésekkel a fehérjéhez való kötődés miatt bekövetkező ligandumhoz tartozó protoncsúcsok intenzitásának csökkenéséből következtetni lehet a megkötődés erősségére. Ezen mérések is jól alátámasztották az ultraszűrési-UV mérési eredményeinket. Valamint felvettük a HSA-ligandum rendszerekre vonatkozó UV különbség spektrumokat is, melyek ligandum-fehérje arány függést mutattak; jelezve, hogy a kölcsönhatás révén a ligandum és/vagy az HSA-hoz tartozó egyedi spektrum a kölcsönhatás révén megváltozott.

A ligandumok megkötődésének helyét közvetlen spektrofluorimetriás mérésekkel, valamint kötőhely marker anyagok (warfarin, danzil-glicin, bilirubin és ibuprofen) segítségével a kompetíciós reakciókat tanulmányozva ultraszűrési-UV, spektrofluorimetria, CZE és CD spektroszkópiás módszerekkel vizsgáltuk, és specifikus kötési állandókat is

számoltunk a mérési adatokból. Ezen részletes vizsgálatok segítségével megállapítottuk, hogy a vizsgált ligandumok közül a dipic és 6-Me-pic képes az HSA mindkét klasszikus gyógyszerszállító kötőhelyén kötődni, de míg a dipic a II.A doménban elhelyezkedő úgynevezett Sudlow-féle I. kötőhelyet preferálja, 6-Me-pic a II. kötőhelyet a III.A. doménban. A gyengébben kötődő pic és mal számára a II. kötőhely bizonyult elsődlegesnek. Együttműködés révén sikerült „docking” számolásokkal is a méréseink alapján feltételezett kötőhelyeken történő kölcsönhatást az adott ligandumok esetén alátámasztani.

#### **Megjegyzések:**

- (i) A kutatási témában (ami köszönetet jelent elsősorban a saját PD050011 sz. pályázatnak, ill. mivel ezen pályázathoz külön kutatási támogatás nem járt a munkát finanszírozó T049417 sz. OTKA pályázatnak) megjelent, vagy már közlésre elfogadott tudományos cikkek száma: **9** (Σ31.07 IF) ill. **2** cikk van közlésre előkészítve, valamint **3** magyar és **9** nemzetközi konferencián való részvétel történt. (Egy cikknél, BBRC 2006 sajnos lemaradt a cikkről a köszönetnyilvánítás.)
- (ii) A kutatási időszak alatt a kutatási témához nem kapcsolódóan még **2** tudományos cikkben (Σ6.78 IF), ill. **1** hazai és **3** nemzetközi konferencia-kiadványban voltam még társszerző.

#### **Rövidítések:**

6-Me-pic	6-metil- pikolinsav
ATP	adenozin 5'-trifoszfát
cit	citromsav
CD	cirkuláris spektroszkópia
CZE	kapilláris zóna elektroforézis
Cys	cisztein
dhp	1,2-dimetil-3-hidroxi-piridinon
dipic	2,6-piridin-dikarbonsav
ESI-MS	elektrospray ionizációs tömeg spektroszkópia
GSH	γ-L-glutamil-L-ciszteinil-glicin, redukált L-glutation
His	hisztidin
HMM	nagy molekulatömegű
HSA	humán szérum albumin
ICP-AES	induktívan csatolt plazma-atom emissziós spektroszkópia
ICP-MS	induktívan csatolt plazma-tömeg spektroszkópia
Ile	izoleucin
LMM	kis molekulatömegű
mal	maltol
pic	pikolinsav
Tf	humán szérum transferrin
Trp	triptofán